

RELATORE Mara Fabri

LAUREANDO Manuel Sfirro

# MECCANISMO CELLULARE DELLA RISPOSTA BOLD NEL CORPO CALLOSO UMANO

DIPARTIMENTO SCIENZE DELLA VITA E DELL'AMBIENTE  
Corso di Laurea in Scienze Biologiche



UNIVERSITÀ  
POLITECNICA  
DELLE MARCHE

Cellular mechanism of the BOLD response in the human corpus callosum

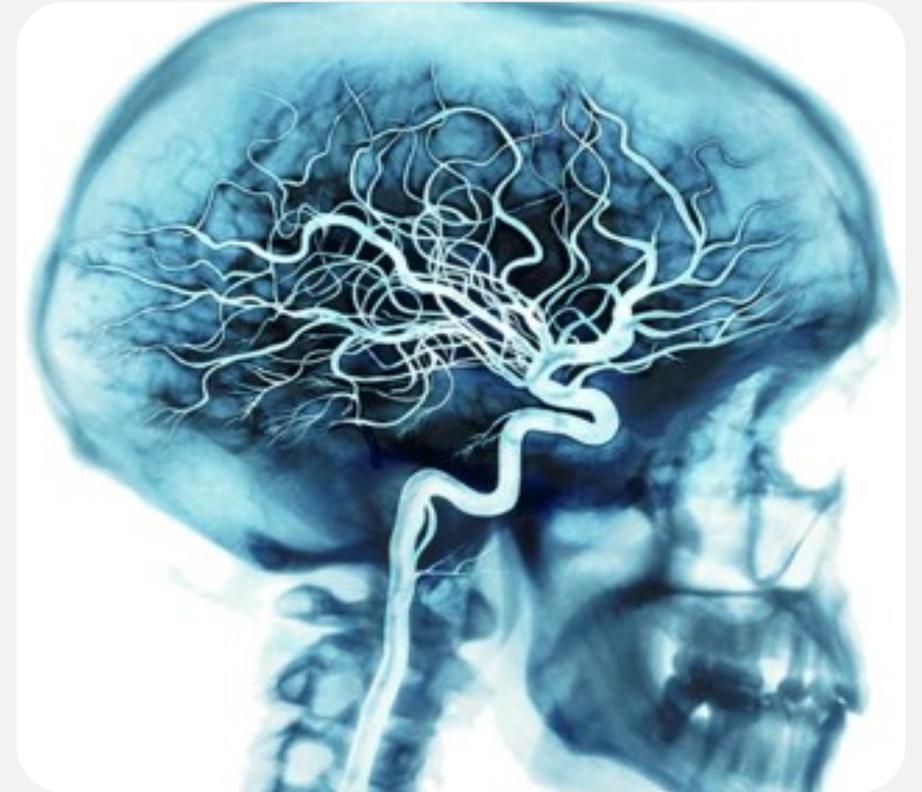
ANNO 2021/2022

## *Il Flusso Sanguigno Cerebrale (CBF)*

Flusso di sangue che arriva effettivamente nelle strutture dell'encefalo e dipende dalla perfusione cerebrale e dal calibro dei vasi. È un fattore che incide sull'**omeostasi cerebrale**

## *Effetto BOLD*

Segnale Dipendente dal Livello di Ossigeno nel Sangue  
Risposta emodinamica può essere evocata anche nella materia bianca (WM) particolarmente evidente nel corpo calloso



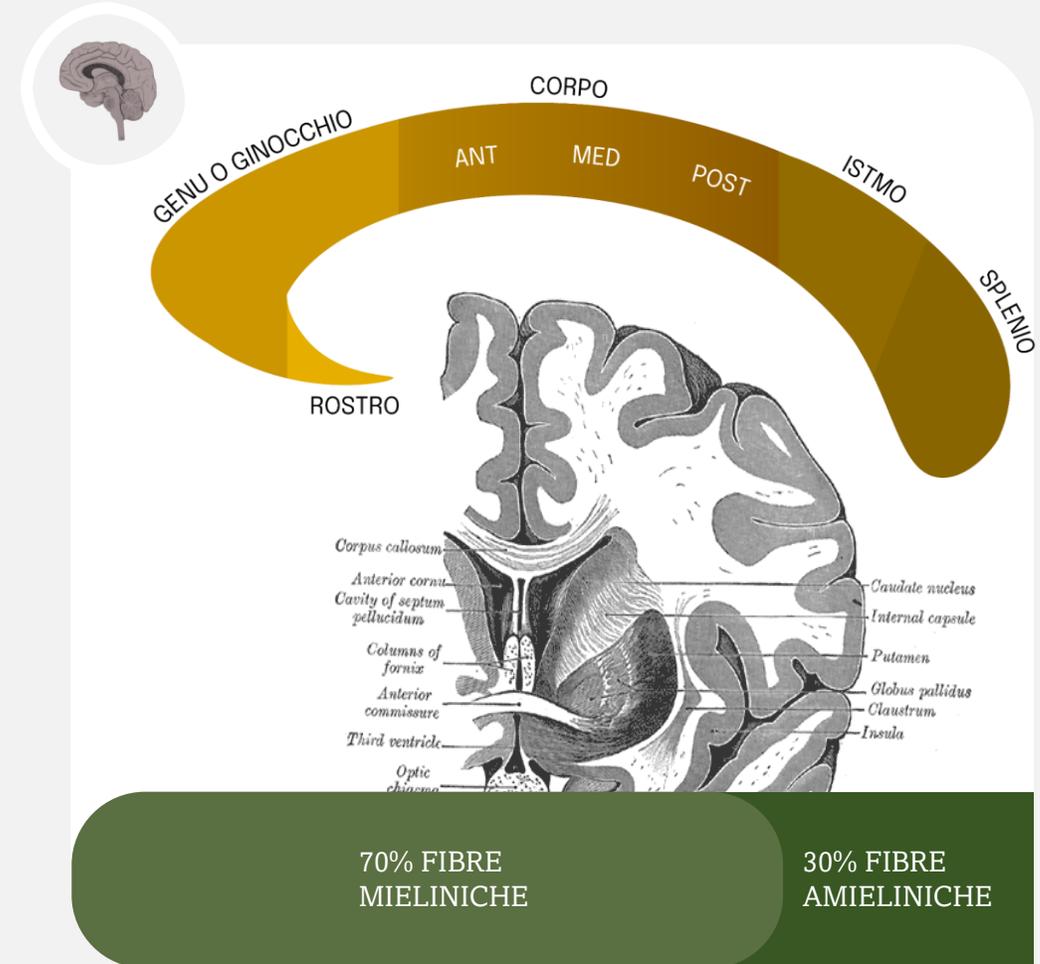
## Caratteristiche anatomiche

- principale commessura interemisferica costituita da Sostanza Bianca (WM)
- Suddivisibile in 5 regioni (da rostrale a caudale)

Diversa composizione delle fibre:

- **Assoni di grande diametro** nella parte posteriore (*splenio*)
- **Assoni di piccolo diametro** nella parte anteriore (*rostro e genu*)

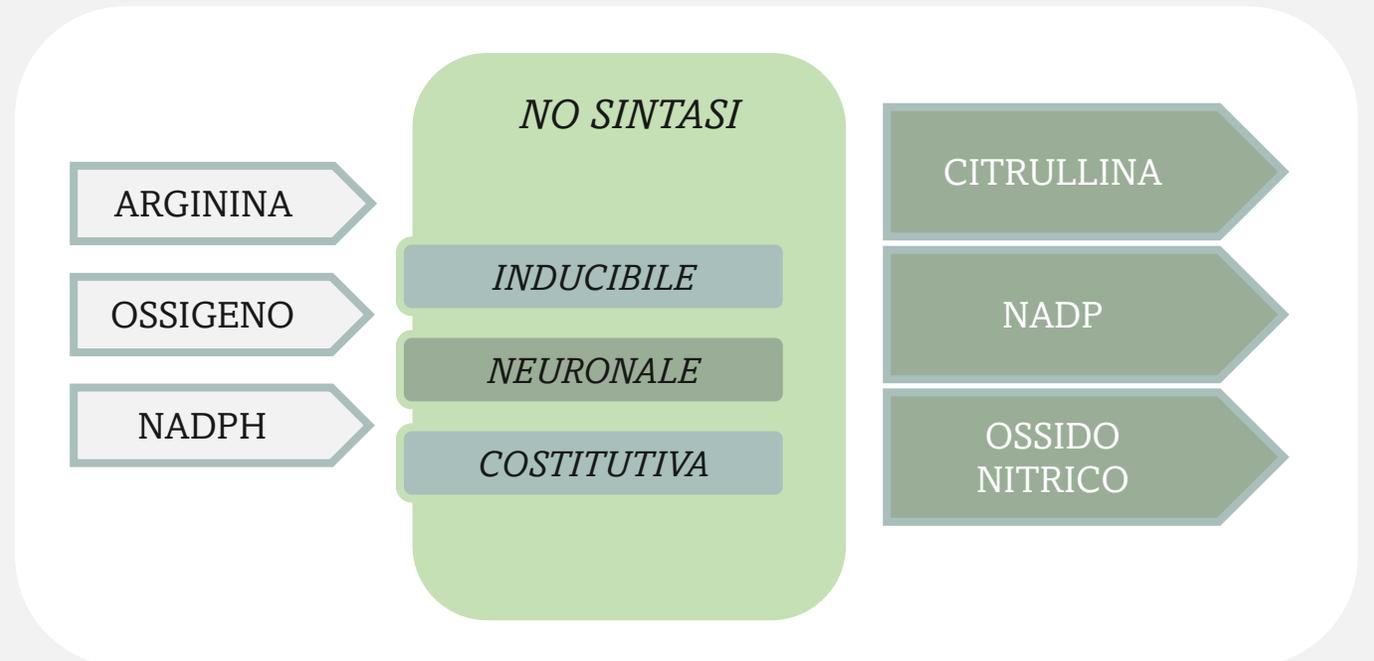
Cellule della glia (oligodendrociti e astrociti, microglia)



## Ossido Nitrico (NO)

**Molecola gassosa** viene rilasciata per semplice diffusione dalle terminazioni nervose

Svolge un ruolo chiave nella **regolazione del flusso ematico cerebrale**



## *Ossido Nitrico Sintasi Neuronale (nNOS)*

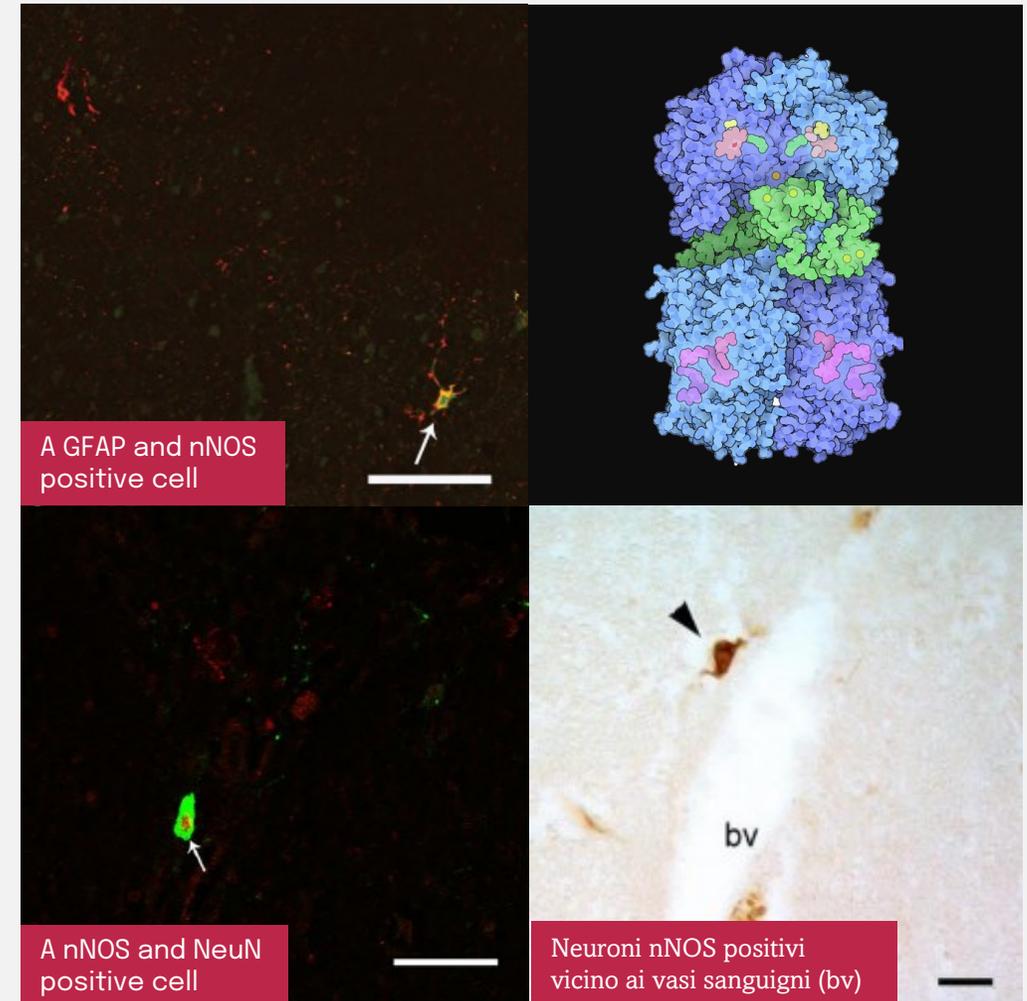
Coinvolta in molti processi fisiologici del sistema nervoso periferico e centrale

**Neuroni** positivi all'enzima marcati con **NeuN** e **nNOS**

**Astroцитi** positivi all'enzima marcati con **GFAP** e **nNOS**

## *Unità neurovascolare*

La risposta emodinamica indotta dall'attività si verifica quando neuroni, astroцитi e cellule vascolari comunicano attraverso un complesso meccanismo di segnalazione.



# SCOPO

Lo studio aveva lo scopo di verificare la presenza nel corpo calloso (CC) umano di neuroni che rilasciano NO come neurotrasmettitore, per spiegare la risposta emodinamica osservata nel CC in precedenti studi.

E' stata quindi utilizzata una tecnica immunohistochimica di doppia marcatura:

con un anticorpo anti-nNOS, l'enzima che sintetizza NO, per identificare gli elementi che contenessero e probabilmente rilasciassero NO come neurotrasmettitore, E

con un anticorpo anti-NeuN, marcatore nucleare delle cellule nervose, per verificare che le cellule marcate con l'anticorpo anti-nNOS fossero neuroni, OPPURE

con un anticorpo anti-GFAP, marcatore nucleare degli astrociti, per verificare che le cellule marcate con l'anticorpo anti-nNOS fossero astrociti.

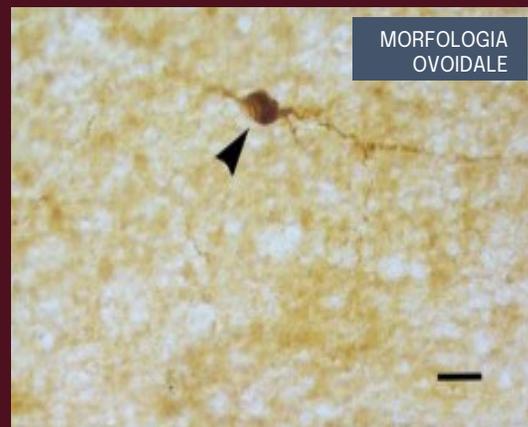
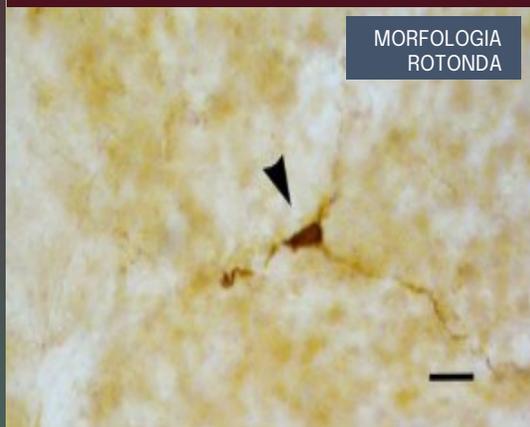
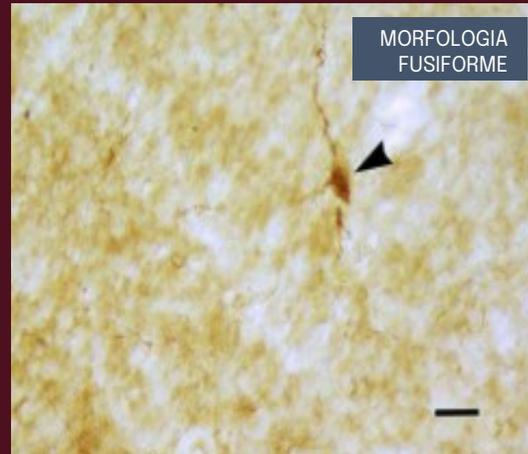
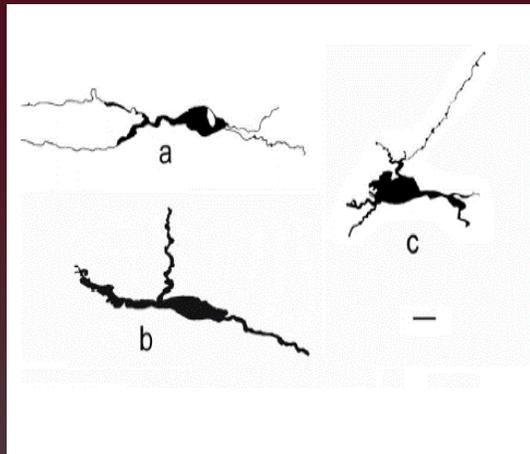
# RISULTATI

## DOPPIA MARCATURA IHC

1. Anticorpo anti-nNOS e anti-NeuN umano per identificare i neuroni nel corpo calloso (CC)

### MORFOLOGIA

- a. Ovoidale
- b. Fusiforme
- c. Rotondi

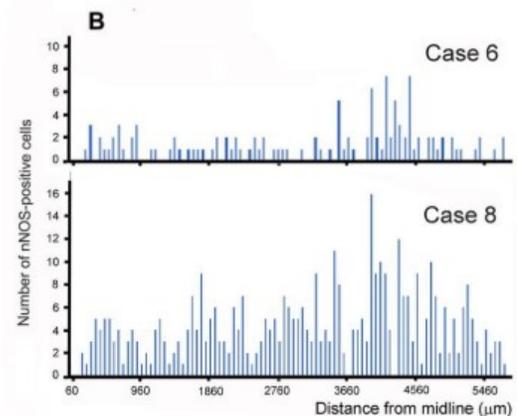
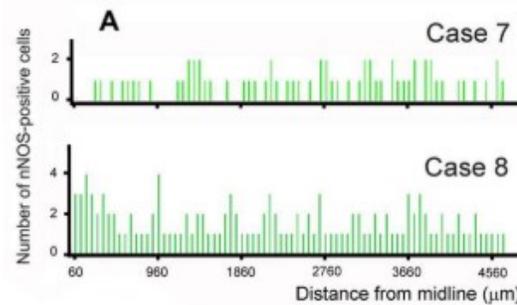
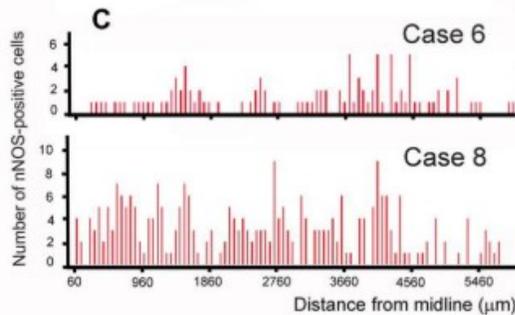
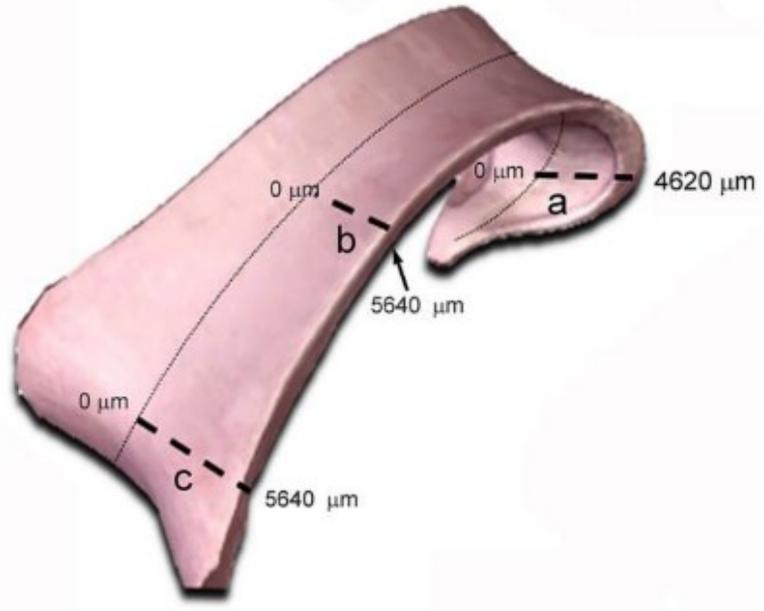


### ANALISI QUANTITATIVA

Tuttavia, i risultati attuali sono in linea con i dati precedenti riportati sul ratto (Barbaresi et al. 2014) e indicano che il CC umano adulto contiene neuroni morfologicamente diversi con una distribuzione areale differente.

Case	Genu	Body	Splenium	Total
6	na	137	108	245
7	64	na	na	64
8	125 (17%)	438 (60%)	173 (23%)	736 (100%)

# RISULTATI



## ANALISI della DISTRIBUZIONE

I neuroni NOS-positivi erano presenti in tutto il CC, più numerosi a 4 mm di distanza dalla linea mediana e presentavano un picco nel corpo del CC. In alcuni casi, erano localizzati al limite superiore del CC, più densamente impacchettati in prossimità delle arteriole callosali.

La presenza significativa di neuroni nNOS-immunopositivi all'interno della commessura suggerisce il loro probabile ruolo nella regolazione neurovascolare del CC nel cervello adulto e potrebbe spiegare l'effetto BOLD rilevato nel CC umano

## RUOLO FUNZIONALE

Assorbimento di neurotrasmettitori e il mantenimento della barriera emato-encefalica.

## CASI SELEZIONATI

Due classi di **tempo agonico**:

1. Inferiore a 10 min
2. Compreso tra 10 min e 24 h

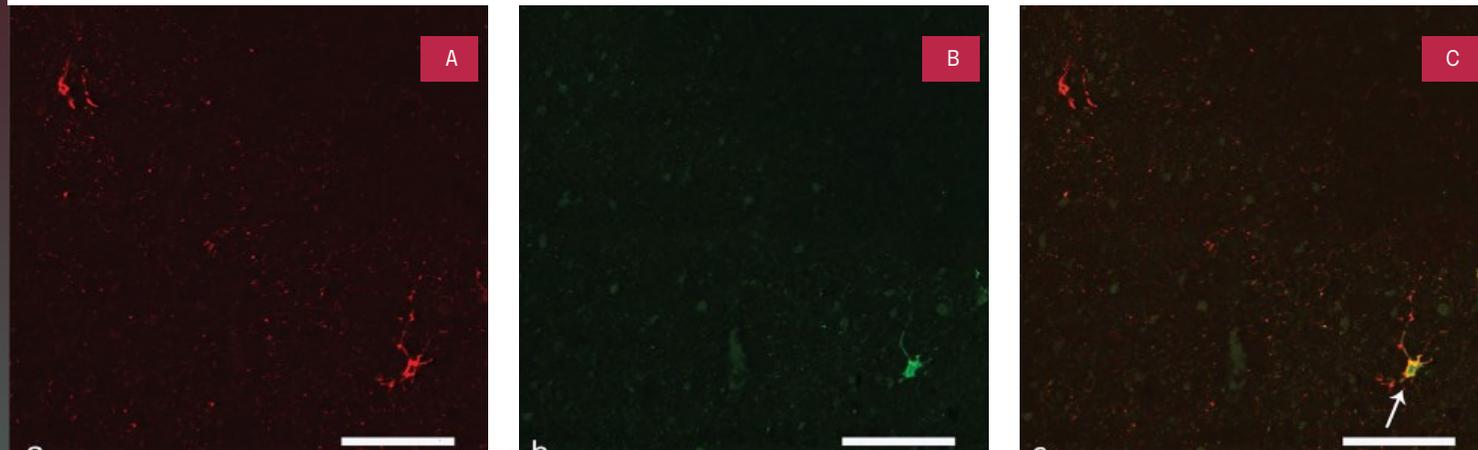
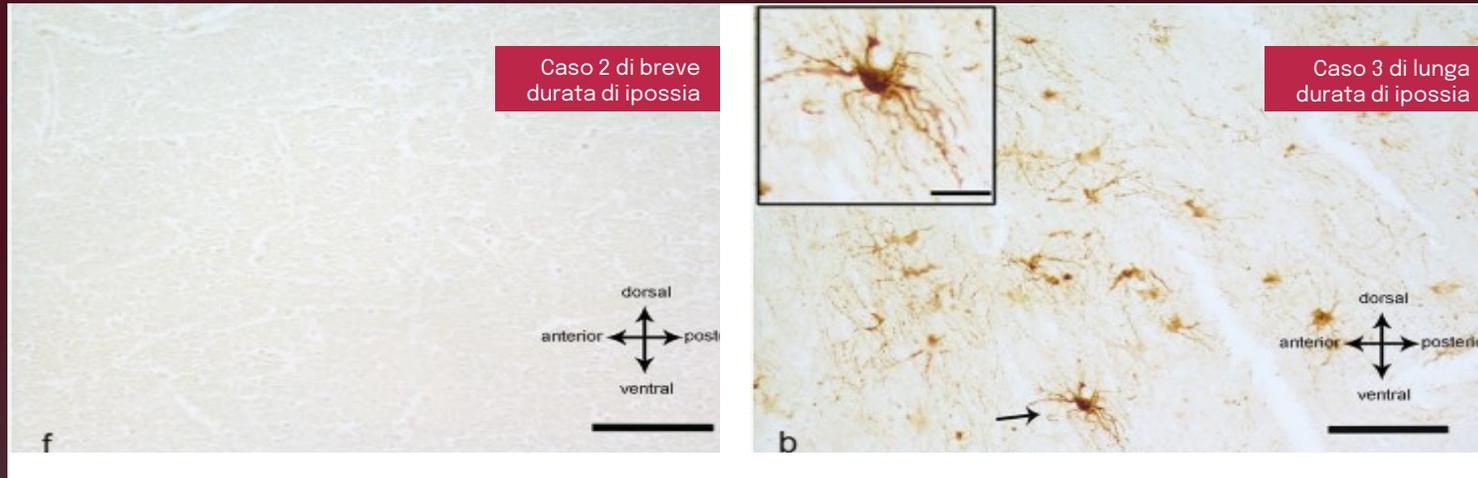
## IPOTESI

1. nei casi di tempo agonale breve, l'ipossia cerebrale avrebbe potuto non verificarsi o comunque si sarebbe verificato con tempi molto brevi ed effetti molto scarsi.
2. Nei casi di tempo agonale molto lungo, invece, si poteva verificare un'ipossia in grado di evocare una reazione del tessuto cerebrale.

Table 1 Autopsy data from selected cases

Case <i>n</i>	Sex	Age	Cause of death	Agonal time (At)		PMI
				At < 10 min	10 min < At < 24 h	
1	F	28	Hanging	x		24
2	F	38	Traumatic vertebral injury after fall	x		48
3	M	51	Drowning		x	24
4	M	61	Acute myocardial infarction	x		72
5	M	79	Electromechanical dissociation		x	48
6	F	41	Thoraco-abdominal injuries in road traffic accident		x	48
7	F	43	Hemorrhagic shock in road traffic accident		x	48
8	F	40	Traumatic brain injury in road traffic accident		x	96
9	M	54	Overdose		x	48
10	M	57	Plastic bag suffocation		x	48
11	F	39	Inhalation of toxic products of combustion and carbon monoxide poisoning		x	72

# RISULTATI



## ANALISI SEMIQUANTITATIVA

Rivela che negli astrociti

- Assenza di cellule immunopositive a nNOS (-)
- Poche cellule Immunopositive (+)
- Numerose cellule immunopositive (++)

Il fatto che alcuni astrociti sono risultati nNOS positivi, indica che questo è lo step per trasformarsi in neuroni

# CONCLUSIONI

Lo studio aveva lo scopo di verificare la presenza nel CC umano di neuroni che rilasciano NO come neurotrasmettitore, per spiegare la risposta emodinamica osservata nel CC in precedenti studi.

A tale scopo è stata utilizzata una tecnica di doppia marcatura con anticorpi anti-nNOS, l'enzima che sintetizza NO, e anti NeuN, marcatore nucleare delle cellule nervose.

Inoltre, in alcuni casi, è stata osservata anche la presenza di astrociti nNOS positivi CC.

Gli astrociti e i neuroni sono possibili attori che regolano il Flusso Ematico Cerebrale durante i cambiamenti dell'offerta o della domanda di ossigeno, poiché può verificarsi durante condizioni fisiologiche o patologiche.

# RIASSUNTO



Negli ultimi anni, un numero crescente di studi di risonanza magnetica funzionale (fMRI) ha riportato l'attivazione della materia bianca (WM), in particolare del corpo calloso (CC; Fabri et al. 2011, 2013; Gawryluk et al. 2011; Polonara et al. 2014). Questa attivazione consiste in un aumento del flusso sanguigno locale dovuto all'incremento dell'attività neuronale. È stato definito segnale dipendente dal livello di ossigeno nel sangue (BOLD) e riflette le risposte emodinamiche accoppiate ai processi di segnalazione neuronale (Iadecola 2004; Lauritzen 2005). Per molto tempo si è ritenuto che l'effetto BOLD fosse dovuto principalmente all'attività metabolica associata all'attività sinaptica piuttosto che a quella di spike e che quindi potesse essere evocato solo nella materia grigia (Logothetis et al. 2001).

Un'ipotesi che spiega l'effetto BOLD coinvolge il neurotrasmettitore gassoso ossido nitrico (NO), eventualmente rilasciato anche dalle cellule del corpo calloso (CC). L'eventuale presenza di neuroni e/o cellule gliali che rilasciano NO nel CC può essere valutata mediante immunistochimica.

E' stata così dimostrata la presenza di neuroni nNOS positivi nel CC umano. Inoltre, in alcuni casi, è stata osservata nel CC anche la presenza di astrociti nNOS positivi, in particolare nei nasi in cui si era verificata un'ipossia prolungata.

Gli astrociti e i neuroni sono i possibili attori che regolano il Flusso Ematico Cerebrale durante i cambiamenti della domanda di ossigeno, che può verificarsi durante condizioni fisiologiche o patologiche. Questo studio sembra indicare che i neuroni nNOS-positivi sono vicini alle arteriole piali che penetrano nel CC e sono circondati dai piedi terminali degli astrociti. Recentemente è stata ipotizzata l'esistenza di un'unità neurovascolare, in grado di controllare il flusso sanguigno del CC a cui parteciperebbero anche neuroni nNOS-positivi presenti nell'Indusium Griseum (Lorenzi et al. 2022). I neuroni NOS-positivi osservati nel CC in prossimità di piccoli vasi più profondi nella WM potrebbero esercitare il controllo finale.